

原 著

1 型糖尿病モデルラットにおける造影剤腎症に 対する *N*-acetylcysteine の予防効果

澁谷 真紀 小原 由香 小島 俊彦 内田 昌希
大竹 一男 内田 博之 小林 順 横田千津子
夏目 秀視

原 著

1 型糖尿病モデルラットにおける造影剤腎症に対する*N*-acetylcysteineの予防効果

Shibuya Maki
澁谷 真紀
Ohtake Kazuo
大竹 一男
Natsume Hideshi
夏目 秀視*

Kohara Yuka
小原 由香
Uchida Hiroyuki
内田 博之

Kojima Toshihiko
小島 俊彦
Kobayashi Jun
小林 順

Uchida Masaki
内田 昌希
Yokota Chizuko
横田千津子

Key words : *N*-acetylcysteine, 造影剤腎症, 糖尿病

緒 言

悪性新生物とならび、わが国の主な死亡原因である心および脳血管疾患の確定診断のために、血管造影検査や造影CT検査などの画像診断が高頻度に行われる。これら画像診断においてヨード造影剤は必要不可欠な体内診断薬であり、本邦のみならず、全世界で一般的に使用されている薬剤の1つである¹⁾。しかし、ヨード造影剤は造影剤腎症と呼ばれる急性の腎障害を起こすことが知られており、臨床現場における大きな問題の1つである^{2,3)}。造影剤腎症は、一般に「造影剤投与後48時間以内に生じた血清クレアチニン値の25%以上の上昇」と定義されている^{2,3)}。その発症率はおよそ10%で、通常1週間程度で回復する可逆的な障害であるが、糖尿病、心不全、高齢者、または既に腎障害を患っている患者ではその発症頻度が50%にまで上昇し、不可逆的な腎不全に陥るケースもある³⁻⁵⁾。造影剤腎症は、院内発症の腎疾患のうち3番目に多く、在院日数の延長や院内死亡率の増加、長期予後の悪化をもたらす⁶⁾。そのため、造影剤腎症は、患者のQOLの低下のみならず、入院延長に伴う医療費増大の面でも解決されるべき問題である。

造影剤腎症の発症機序はいまだ明確に解明されていない。フリーラジカルの関与や糸球体血管内皮細胞の

障害、腎髄質の酸素低下による腎血流量の低下、あるいは尿細管細胞への直接的な傷害が考えられている⁷⁻⁹⁾。近年、その予防に抗酸化作用を有する*N*-acetylcysteine (NAC) が有効であるという臨床結果が報告された^{2,3,9-12)}。しかし、その一方でNACには明らかな予防効果が望めないとする報告もある¹³⁻¹⁵⁾。

当研究室では、ヒトの臨床試験において造影剤腎症に対するNACの予防効果は糖尿病で最も高いことを報告している¹⁶⁾。そこで本研究では、造影剤腎症の臨床所見に近い条件のモデルラットの作製を試み、造影剤腎症に対するNACの効果を検討した。すなわち、ストレプトゾトシン誘発性1型糖尿病モデルラットを作製し、インスリン投与により、長期間飼育することで腎機能を悪化させたラットに、造影剤のイオヘキソールを投与した後の腎機能の変化とそれに対するNACの予防効果を調べた。

材料および方法

1. 材 料

1) 試 薬

N-acetyl-L-cysteineを和光純薬工業株式会社(大阪)から、ストレプトゾトシン(STZ)をCalbiochem (CA, USA)から、オムニパーク®(イオヘキソール)を第一三共株式会社(東京)から、レベミル®(インスリンデテミル(遺伝子組み換え))をノボノルディスク

*城西大学薬学部

表1 Control群およびⅠからⅢ群の群分け

Groups	STZ (intravenous administration into tail vein)	Insulin (subcutaneous administration)	Feeding period
Control	Citric buffer*	—	6 weeks (n = 4) 10 weeks (n = 6) 14 weeks (n = 5)
Ⅰ	60 mg/kg	—	6 weeks (n = 13)
Ⅱ	60 mg/kg	2 units/every other day	10 weeks (n = 24)
Ⅲ	60 mg/kg	2 units/every other day	14 weeks (n = 16)

*: STZの代わりにクエン酸緩衝液を投与し、ⅠからⅢ群と同期間飼育した。

表2 ⅠからⅢ群のサブグループと薬剤投与条件

Subgroups	NAC(peroral administration)		Omnipaque® (intravenous administration into jugular vein)
	At one time	Total dose	
A	Saline	Saline	Saline
B	Saline	Saline	6 mL/kg
C	20 mg/kg	80 mg/kg	6 mL/kg
D	40 mg/kg	160 mg/kg	6 mL/kg

ファーマ株式会社(東京)から、ソムノペンチル®(ペン
トバルビタールナトリウム)を共立製薬株式会社(東
京)から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の
特級品を用いた。

2) 測定キット

ラボアッセイ™クレアチニンおよびマイクロTP-テ
ストワコーを和光純薬工業株式会社(大阪)から、NAG
テストシオノギを塩野義製薬株式会社(大阪)から購入
した。

2. 動 物

SD系雄性ラット(4週齢)をエスエルシー株式会社
(静岡)から購入した。ラットを室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル12時間(7:00~19:00)の飼育
室で自由摂食および自由飲水できるように飼育した。
本研究におけるラットを用いたすべての実験は、城西
大学動物実験規定に従い、城西大学全学動物実験管
理委員会の承認を得て行った。

3. 糖尿病モデル動物の作製法

4週齢のラットの尾静脈よりクエン酸緩衝液
(pH4.7)に溶解したSTZ(60 mg/kg)を投与した。STZ

投与48時間および2週間後に血糖値を測定した。STZ
投与48時間後の随時血糖値が 350 mg/dL 以上のラット
を糖尿病(DM)モデル動物として実験に用いた。

4. 群 分 け

表1に示すように、DMモデルラットをインスリン
の投与の有無および飼育期間によりⅠからⅢ群に分け
た。また、STZを溶解していないクエン酸緩衝液およ
び以降の検討で造影剤の代わりに生理食塩水を投与し
た正常腎機能を有するラットをcontrol群とした。Con
trol群はⅠからⅢ群の飼育期間ごとに用意した(表1)。
表2に示したように、ⅠからⅢ群のDMモデルラット
を、造影剤(オムニパーク®)投与の有無、NAC投与の
有無およびNACの投与量によりAからDのサブグルー
プに分けた。サブグループAは、造影剤、NACともに
投与せず、サブグループBは造影剤のみ投与した。サブ
グループCとDは造影剤、NACともに投与し、NACの
投与量が倍量異なっている。

5. 薬剤の投与とサンプルの採取¹⁷⁾

STZ静脈内投与2日後からNAC投与までの期間に、
ⅡからⅢ群のラットには持効性インスリンアナログ注

射液のレベミル[®] (2 units/every other day)を隔日皮下投与した(表1)。造影剤を投与する24時間前から、ⅠからⅢ群のサブグループCおよびDのラットに対し、生理食塩水に溶解したNACを12時間ごとに2回経口投与した(20 mg/mL, 1回当たり20 mg/kg: サブグループC, 40 mg/mL, 1回当たり40 mg/kg: サブグループD)。比較対照として、control群およびⅠからⅢ群のサブグループAおよびBに生理食塩水を同量経口投与した。2回目のNAC経口投与直後からラットを代謝ケージにて飼育し、12時間蓄尿を行い尿サンプルを採取した。2回目のNAC投与の12時間後、ラットをジエチルエーテルで麻酔し、固定台に背位固定した。ラットの右頸静脈を露出し、造影剤(オムニパーク[®]) (6 mL/kg)を右頸静脈内に投与した。造影剤静脈内投与後、医療用針付縫合糸(17 mm角1/2黒ナイロン5-0, 松田医科工業株式会社, 東京)を用いて右頸静脈部を縫合した。造影剤投与後12時間および24時間に上と同様に、サブグループAおよびBに生理食塩水、サブグループCおよびDにNACを同量投与した。造影剤投与後24時間まで代謝ケージにてラットを飼育し、尿サンプルの採取も12時間ごとに行った。造影剤投与24時間後、ラットにソムノペンチル[®] (40 mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔した。血液サンプルを下大静脈より採取し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて灌流後、両腎臓を摘出し、重量を測定した。血液および尿サンプルを15,000 rpm (17,860 g)で5分間遠心分離し、血漿または尿を0.6 mL得た。

6. 各種検査項目の測定

1) 血漿および尿中クレアチニン濃度の測定

クレアチニンの測定にはラボアッセイTMクレアチニンを用い、マニュアルに従った。血漿および蒸留水で10倍に希釈した尿を検体とした。これら血漿および希釈尿検体、クレアチニン標準液および試薬盲検用蒸留水の各0.25 mLに、除タンパク試液(タングステン酸ナトリウムリン酸含有)1.5 mLを攪拌しながら加えた。遠心分離(3,000 rpm, 10分間)後、それぞれの上清1.0 mLを28℃の水槽で5分間加温後、これらにピクリン酸(22 mmol/L)試液および0.75 N水酸化ナトリウム溶液を加え、28℃の水槽中で20分間加温した。分光光度計(UV mini-1240, 島津製作所, 京都)を用いて、波長520 nmで検体の吸光度を測定した。希釈したクレアチニン標準液から得られた吸光度により検量線をひき、血漿および尿中クレアチニン濃度を算出した。なお、対照として試験盲検用蒸留水を用いた。

2) 尿中タンパク排泄量の測定

尿中タンパク排泄量の測定にはマイクロTP-テストワコーを用い、マニュアルに従って行った。尿を検体とした。尿検体、タンパク標準液および試薬盲検用蒸留水の各0.1 mLに発色試液(0.1 Mグリシン緩衝液 pH2.2, ピロガローススルホンフタレイン (ピロガロールレッド) 0.067 mmol/L, モリブデン酸アンモニウム 0.024 mmol/L) 1.4 mLを順次加え、室温で20分間インキュベートした。分光光度計を用いて、波長600 nmで検体およびタンパク標準液の吸光度を測定した。タンパク標準液から得られた吸光度により検量線をひき、検体の尿中タンパク排泄量を算出した。なお、対照として試験盲検用蒸留水を用いた。

3) 尿中N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) 漏出量の測定

尿中NAG漏出量を尿中NAG活性として測定した。尿中NAG活性の測定にはNAGテストシオノギを用い、マニュアルに従って行った。未知検体用、基質ブランク用およびNAG標準溶液用の合成基質液(ソジオ-m-クレゾールスルホンフタレイニルN-アセチル-β-D-グルコサミニド(MCP-NAG))を0.05 mLずつ取り、37℃で5分間加温した。未知検体、NAG標準溶液または基質ブランク用蒸留水を0.05 mL正確に加え、攪拌した。37℃で正確に15分間インキュベーション後、反応停止液(炭酸ナトリウム含有)1.0 mLを加え、分光光度計を用いて、波長580 nmで未知検体およびNAG標準溶液の吸光度を測定した。なお、対照として基質ブランク用蒸留水を用い、未知検体のNAG活性を求めた。

7. 腎障害の評価方法

腎障害パラメーターとして、血漿クレアチニン濃度、体重当たりの糸球体ろ過速度(GFR)、尿中タンパク排泄量、尿中NAG漏出量および腎肥大率を用いた。

(1) 式よりGFRを、(2)式より腎肥大率を算出した。尿中タンパク排泄量および尿中NAG漏出量は、尿量によって変動するため、得られた値を尿量で除した。

$$GFR = \frac{\text{尿中クレアチニン値} \times \text{尿量}}{\text{血漿クレアチニン値} \times \text{体重}} \quad (1)$$

$$\text{腎肥大率} = \frac{\text{片腎重量}}{\text{体重}} \times 100 \quad (2)$$

8. 統計解析

エクセル統計StatMate III for Windowsソフト(v3.14)を用いて統計解析を行った。データを一元配置分散分析法で解析した後、各群間の差をTukey-Kra-

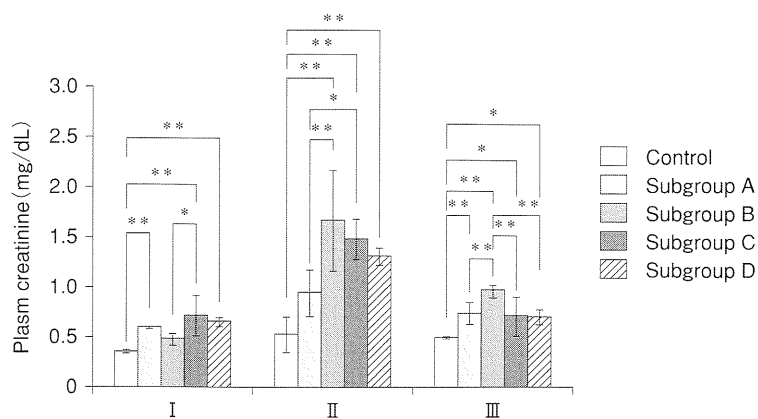


図1 造影剤投与後24時間の血漿クレアチニン値
mean ± S.E. n = 3 ~ 6. * : p < 0.05, ** : p < 0.01

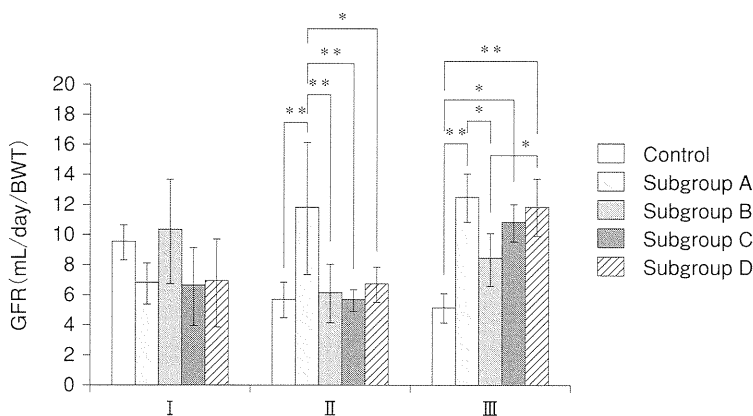


図2 造影剤投与後24時間のGFR
mean ± S.E. n = 3 ~ 6. * : p < 0.05, ** : p < 0.01

merの多重比較検定で解析した。p < 0.05を有意と判定した。

結 果

1. 血漿クレアチニン値

図1にI群からIII群の造影剤投与後の血漿クレアチニン値を示す。また、control群の血漿クレアチニン値はIからIII群のcontrol値である(表1参照)。I群において、サブグループBの血漿クレアチニン値はサブグループAと比較して低下する傾向を示した。また、サブグループCはサブグループBと比較して高い血漿クレアチニン値を示した(サブグループC : p < 0.05)。一方、IIおよびIII群において、サブグループBの血漿クレアチニン値はサブグループAと比較して有意に高かった(both groups : p < 0.01)。この両群において、サブグループCおよびDの血漿クレアチニン値はサブグループBと比較して低い値を示した(III群 : サブグ

ループCおよびD : p < 0.01)。これらの結果より、インスリン投与群において、造影剤の投与は血漿クレアチニン値の有意な上昇を引き起こし、NAC投与により用量依存的な予防効果が認められた。

2. GFR

図2にI群からIII群の造影剤投与後の体重当たりのGFRを示す。I群において、サブグループBのGFRはサブグループAと比較して高くなる傾向を示した。また、サブグループCおよびDではサブグループAとほぼ等しいGFRであった。一方、IIおよびIII群では、サブグループBのGFRがサブグループAと比較して有意に低値を示した(II群 : p < 0.01, III群 : p < 0.05)。II群のサブグループCおよびDはサブグループAと比較してGFRは有意に低い値を示し(サブグループC : p < 0.01, サブグループD : p < 0.05)、サブグループBとほぼ同じであった。しかし、III群のサブグループDのGFRはサブグループBと比較して高い値を示した(p < 0.05)。これらの結果より、インスリン投与群において、造影剤

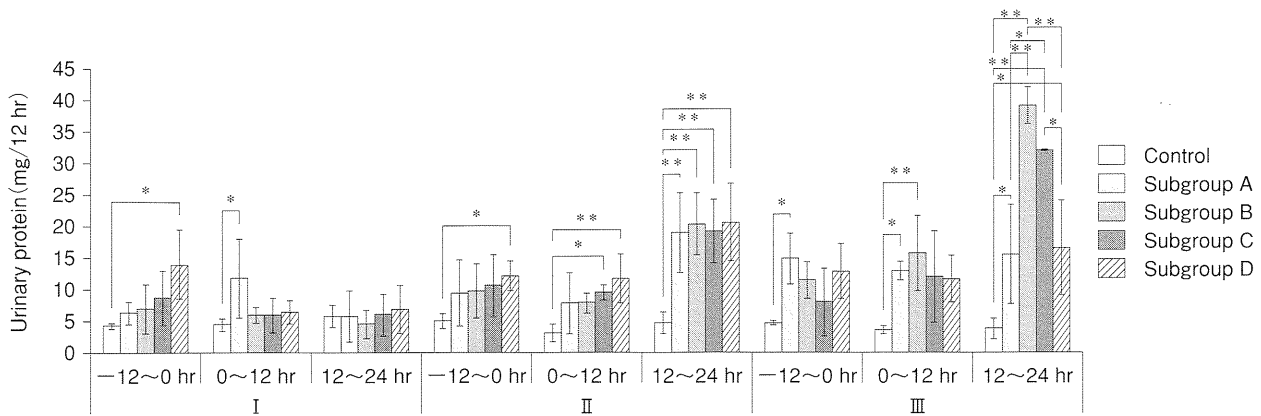


図3 造影剤投与前後の尿中タンパク排泄量
mean \pm S.E. n = 3 ~ 6. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

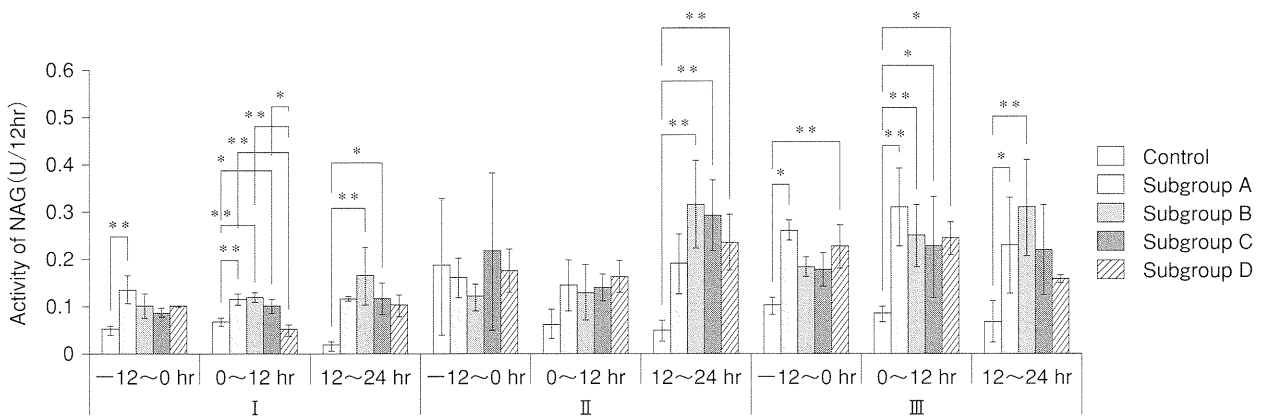


図4 造影剤投与前後の尿中NAG漏出量
mean \pm S.E. n = 3 ~ 6. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

の投与は有意なGFRの低下を起し、また、より長期間飼育したⅢ群ではそれに対するNACの用量依存的な効果が認められた。

3. 尿中タンパク排泄量

図3にⅠ群からⅢ群の造影剤投与前後の各12時間ごとの尿中タンパク排泄量を示す。Ⅰ群において、サブグループBの尿中タンパク排泄量は造影剤投与後0から24時間まで大きな変化は認められなかった。それに対し、Ⅲ群において、サブグループBの造影剤投与後12~24時間の尿中タンパク排泄量はサブグループAと比較して有意に増加した($p < 0.01$)。また、同群の造影剤投与後0~12時間の尿中タンパク排泄量はNACを投与したサブグループCおよびDでサブグループBよりも減少する傾向を示し、さらに、造影剤投与後12~24時間では、NACの用量依存的な尿中タンパク排泄量の抑制効果が認められた。

4. 尿中NAG漏出量

図4にⅠ群からⅢ群の尿中NAG漏出量を示す。Ⅰか

らⅢ群において、造影剤投与後12~24時間におけるサブグループBの尿中NAG漏出量は、サブグループAと比較して高い傾向を示した。また、造影剤投与後12~24時間において、NACは用量依存的に造影剤投与による尿中NAG漏出量を抑制する傾向を示した。

5. 腎肥大率

図5にⅠ群からⅢ群の造影剤投与後24時間の腎肥大率を示す。ⅠからⅢ群の両腎臓におけるサブグループA, B, CおよびDの腎肥大率は、control群と比較して有意に高かった。

考 察

本研究では、まず、造影剤腎症に対するNACの予防効果を明確に評価するために、より臨床所見に近いモデルラットの作製を試みた。その結果、Ⅰ群のラットでは、造影剤投与による血漿クレアチニン値の上昇およびGFRの低下は惹起できなかった。この結果は、Ⅰ

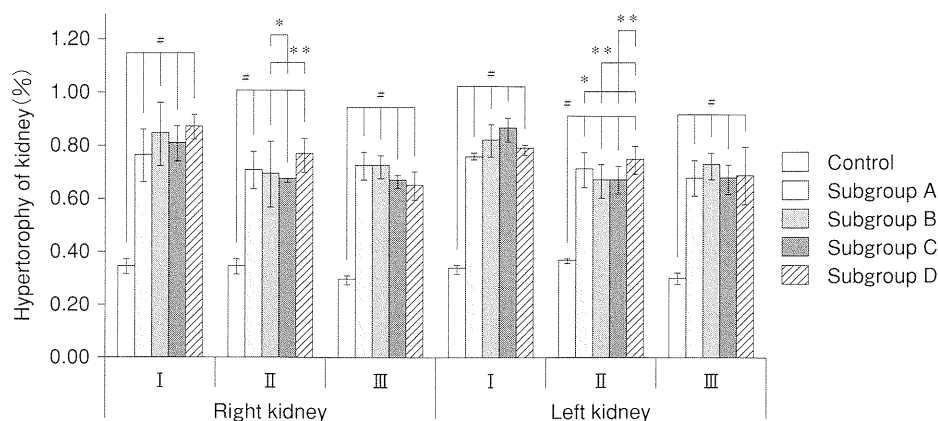


図5 造影剤投与後24時間における腎肥大

mean \pm S.E. n = 3 ~ 6. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, #: $p < 0.01$ compared with control

群のラットの糖尿病性腎症が腎不全にまで至らない比較的軽度の器質的な障害であり、造影剤の高い浸透圧によりhyperfiltrationが生じることでGFRの上昇とそれに伴う血漿クレアチニン値の低下が引き起こされたと考えられた。I群のラットにおいて、NACを投与したサブグループCおよびDではサブグループBよりもGFRの低下および血漿クレアチニン値の上昇が認められた。この結果から、腎不全に至らない器質的な腎障害を有する場合、NACは造影剤の高い浸透圧によるhyperfiltrationを抑制する効果があると考えられた。しかし、造影剤腎症に対するNACの効果を評価するには造影剤腎症の定義を満たさない不十分なモデルであると考えられた。一方で、より長期間飼育したIIおよびIII群のラットの糖尿病性腎症(サブグループB)は腎不全にまで至る障害であったために、I群で認められた造影剤投与後のhyperfiltrationは生じず、造影剤腎症の所見である血漿クレアチニン値の上昇およびGFRの低下を起こすことができたと考えられる。これらの結果から、IIおよびIII群のラットはNACの予防効果を評価するのに適したモデルと考えられた。

そこで次に、このモデルラットを用いて造影剤腎症に対するNACの予防効果と、NACの投与量の影響について評価した。その結果、STZ投与後、インスリン投与により14週間飼育したラットにおいて、NACは造影剤の投与による血漿クレアチニン値の上昇を抑制し、GFRの低下も抑制した(図1, 2)。また、NAC投与群(サブグループCおよびD)ではサブグループBと比較して尿中タンパク排泄量および尿中NAG漏出量に対する用量依存的な抑制効果が認められた(図3, 4)。すなわち、NACは造影剤の引き起こす糸球体障害および尿細管傷害に対して、用量依存的な抑制効果を有す

と考えられる。このNACの造影剤腎症に対する用量依存的な予防効果は多数の文献で報告されており、本研究での結果はそれらと一致した¹⁰⁾。

結論として、本研究で作製したSTZ投与後、インスリン投与により長期間飼育したDMモデルラットは造影剤腎症を発症させることのできる有用なモデルであると考えられ、さらに、NACは造影剤による糸球体障害および尿細管傷害に対して、用量依存的な予防効果を有すると考えられた。しかし、本研究で作製したモデルラットは造影剤腎症に対するNACの予防効果を評価するまでに長期間を要するので、今後、より簡便に造影剤腎症を発症しやすい中等度の腎障害を有するモデルラットを作製することも必要になるかもしれない。

文 献

- 1) Kimmel M, Butscheid M, Brenner S, et al : Improved estimation of glomerular filtration rate by serum cystatin C in preventing contrast induced nephropathy by *N*-acetylcysteine or zinc—preliminary results. *Nephrol Dial Transplant* 2008 ; **23** : 1241-1245.
- 2) Kay J, Chow WH, Chan TM, et al : Acetylcysteine for prevention of acute deterioration of renal function following elective coronary angiography and intervention : a randomized controlled trial. *JAMA* 2003 ; **289** : 553-558.
- 3) Duong MH, MacKenzie TA, Malenka DJ : *N*-acetylcysteine prophylaxis significantly reduces the risk of radiocontrast-induced nephropathy : comprehensive meta-analysis. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005 ; **64** : 471-479.
- 4) Solomon R, Werner C, Mann D, et al : Effects of saline, mannitol, and furosemide to prevent acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. *N Engl J Med* 1994 ; **331** : 1416-1420.

- 5) Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RI : The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. JAMA 1996 ; **275** : 1489-1494.
- 6) Gazi S, Altun A, Erdogan O : Contrast-induced nephropathy : preventive and protective effects of melatonin. J Pineal Res 2006 ; **41** : 53-57.
- 7) Zhao Y, Tao Z, Xu Z, et al : Toxic effects of a high dose of non-ionic iodinated contrast media on renal glomerular and aortic endothelial cells in aged rats *in vivo*. Toxicol Lett 2011 ; **202** : 252-260.
- 8) Itoh Y, Yano T, Sendo T, et al : Involvement of *de novo* ceramide synthesis in radiocontrast-induced renal tubular cell injury. Kidney Int 2006 ; **69** : 288-297.
- 9) Romano G, Briguori C, Quintavalle C, et al : Contrast agents and renal cell apoptosis. Eur Heart J 2008 ; **29** : 2569-2576.
- 10) Tepel M, van der Giet M, et al : Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. N Engl J Med 2000 ; **343** : 180-184.
- 11) Birck R, Krzossok S, Markowetz F, et al : Acetylcysteine for prevention of contrast nephropathy : meta-analysis. Lancet 2003 ; **362** : 598-603.
- 12) Kelly AM, Dwamena B, Cronin P, et al : Meta-analysis : effectiveness of drugs for preventing contrast-induced nephropathy. Ann Intern Med 2008 ; **148** : 284-294.
- 13) Boccalandro F, Amhad M, Smalling RW, et al : Oral acetylcysteine does not protect renal function from moderate to high doses of intravenous radiographic contrast. Catheter Cardiovasc Interv 2003 ; **58** : 336-341.
- 14) Coyle LC, Rodriguez A, Jeschke RE, et al : Acetylcysteine In Diabetes (AID) : a randomized study of acetylcysteine for the prevention of contrast nephropathy in diabetics. Am Heart J 2006 ; **1032** : e9-e12.
- 15) Schmidt P, Pang D, Nykamp D, et al : *N*-acetylcysteine and sodium bicarbonate versus *N*-acetylcysteine and standard hydration for the prevention of radiocontrast-induced nephropathy following coronary angiography. Ann Pharmacother 2007 ; **41** : 46-50.
- 16) 岡本 浩, 宮内雅弘, 西山雅巳ほか : ヨード造影剤による腎障害に対する*N*-アセチルシステインの経口投与の有効性. 心臓 2006 ; **38** : 915-923.
- 17) Marenzi G, Assanelli E, Marana I, et al : *N*-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy in primary angioplasty. N Engl J Med 2006 ; **354** : 2773-2782.

Preventive Effect of N-acetylcysteine on Contrast-Induced Nephropathy in 1 Type Diabetes Mellitus Model Rats

Maki Shibuya, Yuka Kohara, Toshihiko Kojima,
Masaki Uchida, Kazuo Ohtake, Hiroyuki Uchida,
Jun Kobayashi, Chizuko Yokota, and Hideshi Natsume*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

Objects : Drug-induced nephropathy is caused by iodinated contrast medium, known as contrast-induced nephropathy (CIN), which has become a serious matter clinically. Recently, several clinical studies have reported that *N*-acetylcysteine (NAC) is promising as a preventive medicine against CIN. On the contrary, other studies have reported that NAC is not useful in prevention against it. In this study, in order to clarify the effect of NAC on CIN, we attempted to produce diabetic nephropathy model rats and investigated the preventive effect of NAC on CIN.

Methods : Streptozotocin (60 mg/kg, STZ) was injected into tail vein to produce diabetic rats. The rats were separated into three groups ; group without any treatments for 6 weeks (I), groups received insulin (2 units/every other day, s.c.) for 10 or 14 weeks (II or III) after administering STZ. NAC (low dose : 20 mg/kg/time, high dose : 40 mg/kg/time) was given orally every 12 hours from 24 hours before to 24 hours after administering Iohexol (6 mL/kg i.v.). The effect of NAC was evaluated by determining plasma creatinine (Cr), *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, total protein levels in urine and hypertrophy of kidney.

Results : In group I, decreased Cr and increased GFR were observed by administering Iohexol. In groups II and III, however, Cr was increased by administering it. Furthermore, it was found that NAC prevented the increase in Cr by administering it dose-dependently in these groups.

Key words : *N*-acetylcysteine, contrast-induced nephropathy, diabetes mellitus